# DIE REPLIKATIONSMUSTER MENSCHLICHER CHROMOSOMEN NACH H3 – CYTIDIN – MARKIERUNG

Heide Koschel

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546016_0032

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Direktor: Prof. Dr. Klaus Betke

# Die Replikationsmuster menschlicher Chromosomen nach H3 - Cytidin - Markierung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen medizinischen Fakultät der
Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Heide Koschel

aus

Stuttgart

1972

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Berichterstatter: Prof. Dr. K. Betke

Mitberichterstatter: Dr. D. Murken

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.6.1972

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

# EINLEITUNG

Seit der Entdeckung von TIJO und LEVAN (1956), daß die Zellkerne der meisten menschlichen Körperzellen 46 Chromosomen besitzen, wurden große Anstrengungen unternommen, um eine Identifizierung der einzelnen Elemente des Karyotyps zu erreichen. Nach morphologischen Kriterien, die vor allem die Größe der Chromosomen und die Position des Zentromers berücksichtigen, lassen sich nur die Chromosomen 1, 2, 3, 16, 17, 18 und das Y-Chromosom erkennen. Größere Erfolge bei der Charakterisierung gelangen GERMAN (1962), MORISHIMA et al. (1962), MOORHEAD und DEFENDI (1963), SCHMID (1963) und in den folgenden Jahren zahlreichen anderen Autoren mit Hilfe einer neuen Methode, der Chromosomenautoradiographie:
Bei diesem zellbiologischen Verfahren wird zunächst Tritium-Thymidin in die DNS der Chromosomen eingeführt. Besondere, direkt auf das markierte Zellmaterial aufgebrachte photographische Emulsionen registrieren dann die emittierten ß-Strahlen des Tritiums. Nach Entwicklung und Fixierung der Filme sind über mehr oder weniger zahlreichen Chromosomenabschnitten Silberkörner zu erkennen, deren Anordnung insbesondere in den letzten zwei Stunden der DNS-Synthese-Periode (S-Periode) für einzelne Chromosomen typisch ist.
Die autoradiographischen Bilder nach Tritium-Thymidin-Markierung sind allerdings bei einer Reihe von menschlichen Chromosomen uncharakteristisch und inkonstant, sodaß auch sie nicht zu einer weiteren Differenzierung beitragen können. Vor allem betrifft das die Chromosomen der C- und F-Gruppe.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es daher zu prüfen, ob sich mit einem anderen DNS-Baustein, und zwar mit Cytidin, bessere Resultate erzielen lassen. Da auf diesem Gebiet noch keine detaillierten Ergebnisse vorlagen, wurden zunächst die Chromosomen 1, 4 - 5 und 13 - 15 zu einem Vergleich herangezogen, deren Morphologie gut definiert ist und die nach Markierung mit Tritium-Thymidin charakteristische Replikationsmuster aufweisen.

## MATERIAL und METHODE

Als Untersuchungsmaterial diente peripheres Blut je einer gesunden männlichen und weiblichen Person. Für die Zellzüchtung zum Zwecke der Chromosomenpräparation wurde die Mikromethode nach HUNGERFORD (1965) mit geringen Modifikationen angewendet:

1. Ansetzen der Blutkulturen, Inkubation und radioaktive Markierung

Jeweils 0,3 ml steril entnommenes, heparinisiertes Venenblut wurde in 5 ml Nährmedium folgender Zusammensetzung gegeben:

| | |
|---|---|
| EBM (Eagle's Basal Medium) | 80,00 ml |
| Foetales Kalbsserum | 15,00 ml |
| Phytohaemagglutinin P | 2,00 ml |
| Liquemin | 0,40 ml |
| Antibiotic. mixt. | 1,00 ml |
| Penicillin 10,0 U/ml<br>Fungizone 25,0 mcg/ml<br>Streptomycin 10,0 mcg/ml | |
| Phenolrot | 0,25 ml |

Der pH-Wert des Mediums war auf 7,2 bis 7,3 eingestellt.
Die Blutkulturen wurden anschließend 70 bis 72 Stunden bei 37°C inkubiert. 7 Stunden vor Abschluß der Bebrütung erhielt jede Kultur 6 µCi/ ml Medium tritiiertes Cytidin (Spezifische Aktivität 1 mCi/ mMol); 2 1/2 Stunden vor Aufbereitung der Zellsuspension wurde ferner 0,001 mµ Desacetyl-methyl-Colchicin (Colcemid/Ciba) hinzugefügt.

2. Aufbereitung der Blutkulturen und Herstellen von Chromosomenpräparaten

Die Kultur wurde folgendermaßen aufbereitet: Die Zellsuspension wurde vorsichtig aufgeschüttelt, mit einer Pasteur-Pipette in ein silikonisiertes Zentrifugengläschen gefüllt und anschließend 5 Min. bei 1000 UpM zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde verworfen und die Zellen im geringen Flüssigkeitsrückstand resuspendiert. Nach Hinzufügen von 5 ml hypotonischer KCl-Lösung (0,075 Mol) wurde die Zellsuspension 5 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und tropfenweise Fixativ (3 Teile Methanol, 1 Teil Eisessig) dazugegeben, bis eine homogene Suspension vorlag. Diese wurde mit Fixativ auf 5 ml aufgefüllt und zentrifugiert. Das Fixativ wurde nun mehrmals gewechselt, bis im Überstand keine Verunreinigungen mehr zu erkennen waren. Anschließend wurde die Zellsuspension 15 Min. bei -15°C gehalten. Nach nochmaligem Wechseln des Fixativs wurde zentrifugiert, das überstehende Fixativ bis auf ca. 0,5 ml abgezogen und das Sediment resuspendiert.
Jeweils ein bis zwei Tropfen der Zellsuspension wurden auf in $CO_2$-Wasser gekühlte Objektträger gespritzt und durch vorsichtiges Blasen verteilt. Die Objektträger wurden bei 40° bis 60°C auf der Wärmplatte getrocknet.

3. Lokalisation von Mitosen

Von den angefertigten Präparaten wurden mit der Phasenkontrastoptik Mitosen lokalisiert, deren Chromosomen gut ausgebreitet waren und möglichst keine Chromosomenüberschneidungen aufwiesen.

4. Entfernung der RNS

Cytidin wird sowohl in die DNS als auch in die RNS eingebaut. Um eine eindeutige Markierung der Chromosomen zu erhalten, mußte daher in einem weiteren Schritt die RNS aus den Präparaten entfernt werden. Die Zellen wurden zu diesem Zweck 2 Stunden bei 37°C mit Ribonuklease (Serva; 125 µg/ml in 1/15 n Phosphatpuffer, pH 6,8) behandelt. Anschließend wurden sie 10 Min. in 5 %ige Trichloressigsäure gegeben und 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen.

5. Chromosomenautoradiographie

Die Autoradiographien wurden nach den Richtlinien von SCHMID (1965) mit AR 10 Strippingfilm (Kodak) angefertigt.
Um eine gute Haftung des Films an den Objektträgern zu gewährleisten, wurde deren Rückseite mit Chromalaungelatine-Lösung (10ml K-Chromalaunlösung mit 90 ml Gelatinelösung gemischt) bestrichen.
In einer mit Rotlicht beleuchteten Dunkelkammer wurde der autoradiographische Film auf einer besonderen Schneidevorrichtung in 4 x 4 cm große Stücke geteilt. Die Glasplatte wurde mit dem zerschnittenen Film nach oben zuerst 2 bis 3 Minuten in 70 %igen Alkohol, anschließend in absoluten Alkohol gelegt. Mit einer spitzen Pinzette wurden die einzelnen Filmquadrate abgehoben und mit der Schichtseite nach unten in aqua dest. gegeben. Auf der Wasseroberfläche breiteten sich die Filmstückchen faltenlos aus und quollen auf. Nun konnte ein Objektträger unter ein Filmquadrat geschoben und mit diesem zusammen ruckartige aus dem Wasser gehoben wer-

den. Die überstehenden Enden des Films falteten sich dabei um den Objektträger. Das Präparat wurde auf eine Glasplatte gelegt und der Film mit aqua dest. betropft. Nach einigen Minuten erfolgte das Glätten des Films mit einem weichen, feuchten Pinsel. Die fertig beschichteten Objektträger wurden in offene Halterungen gestellt und in einer lichtdichten Trocknungsapparatur 2 bis 3 Stunden getrocknet.

Die Exposition der Präparate erfolgte in lichtdichten Schachteln bei 4°C. Um einen optimalen Markierungsgrad der Chromosomen zu erzielen, wurden nach 14 bzw. 17 Tagen Kontrollpräparate entwickelt. Bei den meisten Versuchen konnte die Exposition nach 21 Tagen abgeschlossen werden.

Die Präparate wurden 2 Minuten in Kodak D 19 b bei 14°C entwikkelt, für wenige Sekunden in Leitungswasser von 19° bis 21°C geschwenkt, um den Entwicklungsvorgang zu stoppen, und bei 19° bis 21°C 5 Minuten fixiert. Anschließend wurden sie 20 bis 30 Minuten gewässert und an einem staubfreien Ort der Dunkelkammer getrocknet.

Die Färbung der Präparate erfolgte in gepufferter Giemsa-Lösung, welche folgende Zusammensetzung hatte:

| | | |
|---|---|---|
| Aqua dest. | | 100 ml |
| Acidum citricum | 0,1 M | 3 ml |
| $Na_2HPO_4$ | 0,2 M | 3 ml |
| Methylalkohol | | 3 ml |
| Giemsa-Stammlösung | | 5 ml |

Nach 2 bis 3 Stunden Trocknen wurde der Film von der Rückseite der Präparate mit einer scharfen Rasierklinge entfernt. Anschlies-

send wurden die Präparate in Euparal eingebettet.
Von den früher lokalisierten Mitosen wurden diejenigen photographiert, deren Chromosomen eine genügende Silberkorndichte aufwiesen.

6. Herstellen von Kontrollbildern

Nach Ablösen der Deckgläser in Xylol wurde der Strippingfilm mit Hilfe von 1 n HCl (8 Min. bei 60°C) entfernt. Danach wurden die Präparate jeweils 5 Minuten mit 7,5 %igem Kaliumferricyanid und 20 %igem Natriumthiosulfat behandelt und 2 Stunden in Schiff'scher Lösung gefärbt. Nach dem Trocknen und Eindecken wurden Kontrollbilder angefertigt.

## ERGEBNISSE

Für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit wurden die autoradiographischen Bilder von insgesamt 41 Mitosen herangezogen, die sich in verschieden weit fortgeschrittenen Phasen der DNS-Synthese am Ende der S-Periode befanden.

### Markierungsmuster des Chromosomenpaares Nr. 1

Das Chromosomenpaar Nr. 1 läßt sich gewöhnlich eindeutig morphologisch identifizieren. Die Chromosomen dieses Paares sind die größten des menschlichen Chromosomensatzes, und ihr Zentromer zeigt stets eine mittlere Position (Abb. 1).
In den letzten zwei Stunden der S-Periode wird die DNS-Synthese in bestimmten Abschnitten des Chromosomenpaares Nr. 1 früher beendet, während sie in anderen kurze Zeit weiter abläuft:

#### 1. Markierungsphase: Frühstadium

Bei Chromosomenpaar Nr. 1 ist die Replikation zuerst am distalen Ende des einen Armes abgeschlossen. Dieses sogenannte Frühstadium konnte bei 15 von 41 Mitosen beobachtet werden. (Abb. 2 a)

#### 2. Markierungsphase: Übergangsstadium

Im Übergangsstadium ist nur noch ein medialer Abschnitt an dem Arm markiert, der als erster seine Replikation distal beendet, während am gegenüberliegenden Arm noch ein proximaler Streifen und die zentromernahe Region markiert sind. (Abb. 2 b)
16 der ausgewerteten Mitosen befanden sich im Übergangsstadium.

3. Markierungsmuster: Spätstadium

Kurz vor dem Ende der S-Periode ist der im Frühstadium völlig markierte Arm nur noch über einer zentromernahen Region mit Silberkörnern bedeckt, während der andere Arm seine Replikation vollständig abgeschlossen hat. (Abb. 2 c)
In diesem Spätstadium befanden sich 10 der ausgewerteten Mitosen.

Bei allen ausgewerteten Mitosen konnte das Chromosomenpaar Nr. 1 morphologisch eindeutig identifiziert werden, ferner zeigte es einen besonders regelmäßigen Ablauf des Markierungsmusters. Aus diesen Gründen wurde es in der vorliegenden Arbeit als Zeitmarker für die Einteilung des Replikationsablaufs der untersuchten Gruppen verwendet.

Markierungsmuster der Gruppe 4 - 5

Die Chromosomen dieser Gruppe gehören zu den größten des menschlichen Chromosomensatzes und sind ungefähr gleich groß wie Paar 3. Im Gegensatz zu diesem hat jedoch ihr Zentromer eine submetazentrische Position.

Die zwei Chromosomenpaare der Gruppe 4 - 5 sind morphologisch nicht voneinander zu unterscheiden, dagegen ist mit Hilfe der Autoradiographie meist eine klare Differenzierung möglich.

Die DNS-Synthese der Gruppe 4 - 5 wird am Ende der S-Periode in der nachstehenden Reihenfolge abgeschlossen:
a) Beide Chromosomenpaare sind noch völlig markiert und daher nicht zu unterscheiden. (Abb. 3 a)

b) Ein Paar wird im proximalen Abschnitt seines langen Armes unmarkiert, während das andere noch völlig markiert ist. (Abb. 3b)
c) Während das eine Paar nur noch über seinem kurzen Arm und im distalen Teil seines langen Armes markiert ist, hat nun auch das andere Paar die Replikation im medialen Teil seines langen Armes beendet. (Abb. 3 c)
d) Das eine Paar hat die Replikation über die ganze Länge seines langen Armes abgeschlossen und ist nur noch über dem kurzen Arm markiert, während sich bei dem anderen Paar die unmarkierte Zone etwas weiter nach distal vergrößert hat. (Abb. 3 d)
e) Ein Paar hat die Replikation über die ganze Länge abgeschlossen, während das andere noch im proximalen Teil seines langen Armes markiert ist.(Abb. 3 e)

In den drei nach dem Markierungsmuster des Chromosoms Nr. 1 festgelegten Stadien der DNS-Synthese konnte folgende Verteilung der Markierungsmuster festgestellt werden:

A: Frühstadium

Von 15 Mitosen zeigten 6 das Muster a und 8 das Muster b. Eine Mitose war für diese Gruppe nicht auswertbar.

B: Übergangsstadium

10 Mitosen wiesen Muster b auf, 5 Mitosen Muster c. Eine Mitose war nicht differenzierbar.

C: Spätstadium

3 Mitosen zeigten Muster b, eine Mitose Muster c und 5 Mitosen Muster d.

Während alle anderen Chromosomen des Komplements ihre Replika-

tion abgeschlossen hatten, war ein Paar noch wie in Abschnitt e beschrieben markiert.

Bei dieser Gruppe wird als Paar Nr. 4 dasjenige bezeichnet, welches die Replikation über seine ganze Länge relativ spät beendet, während bei Paar Nr. 5 der lange Arm früh unmarkiert ist.

Markierungsmuster der Gruppe 13 - 15

Die Chromosomen der Gruppe 13 - 15 sind mittelgroß und akrozentrisch und zeigen häufig sog. Satelitten über dem kurzen Arm. Morphologisch sind die drei Paare untereinander nicht zu unterscheiden, mit Hilfe der autoradiographischen Markierung kann jedoch eine weitere Differenzierung getroffen werden.
Folgender Ablauf des Replikationsabschlusses wurde beobachtet:
a) Vier Chromosomen sind noch vollständig markiert, während zwei die Replikation ihres langen Armes distal beendet haben. (Abb. 4 a)
b) Zwei Chromosomen haben im Bereich ihrer kurzen Arme die Replikation abgeschlossen, während zwei andere Chromosomen noch vollständig markiert sind. Bei dem letzten Paar hat sich die unmarkierte Zone etwas mehr nach proximal vergrößert. (Abb. 4 b)
c) Vier Chromosomen zeigen das gleiche Replikationsmuster wie bei Phase b, ein Paar ist über seine ganze Länge unmarkiert. (Abb. 4 c)
d) Bei einem Paar ist die Replikation noch nicht weiter fortgeschritten. Das zweite Paar ist am distalen Ende seines langen Armes unmarkiert, während das dritte nur noch über seinem kurzen Arm mar-

kiert ist. (Abb. 4 d)

e) Das erste Paar hat die Replikation über seinem langen Arm etwas weiter nach distal abgeschlossen, während das zweite über dem proximalen Abschnitt seines langen Armes und über seinem kurzen Arm markiert ist. Das dritte Paar ist völlig unmarkiert. (Abb. 4 e)

f) Ein Paar ist noch über der distalen Hälfte seines langen Armes markiert, während die beiden anderen Paare die Replikation über ihre ganze Länge abgeschlossen haben. (Abb. 4 f)

In den drei nach dem Markierungsmuster des Chromosoms Nr. 1 festgelegten Stadien der DNS-Synthese konnten bei dieser Gruppe folgende Markierungsmuster beobachtet werden:

A: Frühstadium

8 Mitosen zeigten das Muster a, 4 Mitosen das Muster b und 3 Mitosen das Muster c.

B: Übergangsstadium

Von 16 Mitosen wiesen 2 das Muster a, 5 das Muster b,8 das Muster d und eine das Muster e auf S. 11.

C: Spätstadium

Eine Mitose zeigte Muster d, 6 Mitosen Muster e und 2 Mitosen Muster f.

Als Nr. 13 wurde das über der Mitte seines langen Armes stark markierte Paar bezeichnet, als Nr. 14 das proximal stark markierte und als Nr. 15 das früh unmarkierte Paar.

## Untersuchung über die Synchronie der Markierungsmuster zwischen den Homologen eines Chromosomenpaares

Bei den untersuchten Mitosen wiesen die Homologen des Chromosomenpaares Nr. 1 im allgemeinen die gleiche Sequenz der DNS-Synthese auf. Nur in wenigen Fällen waren geringe zeitliche Verschiebungen zu beobachten.

5 der 41 Figuren zeigten stärkere Grade der Asynchronie, wie zum Beispiel Frühstadium - Übergangsstadium; Übergangsstadium - Spätstadium; Spätstadium - keine Markierung.

Die Gruppe 4 - 5 zeigte häufiger als Nr. 1 eine Asynchronie, beispielsweise war bei Nr. 4 das eine Chromosom noch ganz markiert, während das andere Muster c aufwies. Bei insgesamt 12 der 41 ausgewerteten Figuren (30 %) konnten stärkere Grade von Asynchronie festgestellt werden.

Die Gruppe 13 - 15 zeigte nur geringe Grade von Asynchronie: In drei Fällen hatte bei Nr. 14 bzw. bei Nr. 15 das eine Chromosom seine Replikation schon beendet, während das andere noch schwach markiert war.

## Strahleninduzierte Chromosomenveränderungen als Nebenbefund dieser Untersuchungen

Es wurden insgesamt 40 Chromosomenbrüche auf 100 Mitosen beobachtet, während in nicht markierten Kulturen zwei bis drei auf 100 vorkommen.

Meist handelte es sich um Chromatidenbrüche ohne Dislokation der Fragmente (13 Chromosomen in 41 Mitosen). Nur bei vier Chromosomen lagen Brüche mit Dislokation vor.

Die durch die Tritium-Inkorporation verursachten Chromosomenveränderungen lagen demnach in dem Rahmen, wie man sie bisher bei der Anwendung dieses Isotops an Zellen des peripheren Blutes gefunden hat.

## DISKUSSION und SCHLUSSFOLGERUNG

Über Einbauversuche mit Tritium-Thymidin an menschlichen Chromosomen wurde seit 1962 von zahlreichen Autoren berichtet: MORISHIMA et al. 1962; GERMAN 1962/64; GILBERT et al. 1962/65; MOORHEAD und DEFENDI 1963; SCHMID 1963/65/67; ATKINS et al. 1963; MUKHERJEE et al. 1963/64; CIANELLI 1963/65/67; YUNIS et al. 1964; PETERSEN 1964; HSU und LOCKHARDT 1964; GEY 1966; BACK et al. 1967; BÜCHNER et at. 1968; ABE 1969.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß die Replikation der menschlichen Chromosomen in einer genetisch genau festgelegten Sequenz erfolgt. Sie beginnt an mehreren Stellen eines Chromosoms gleichzeitig und zeigt zwischen den verschiedenen Chromosomenpaaren während ihres weiteren Verlaufs eine deutliche Asynchronie. Auch innerhalb eines Chromosoms läuft die Replikation nicht gleichmäßig ab. Dies läßt sich besonders gut in den beiden letzten Stunden der S-Periode beobachten, wenn bestimmte Chromosomenabschnitte ihre Replikation schon beendet haben, während andere noch DNS synthetisieren. Außerdem schließen im allgemeinen die heterochromatischen Anteile des Genoms ihre Replikation später ab als die euchromatischen Anteile. Die autoradiographischen Bilder der markierten Chromosomen zeigen daher charakteristische Muster, wobei homologe Chromosomen im allgemeinen dieselben Markierungsmuster in der gleichen Reihenfolge durchlaufen. An Hand dieser Muster können ein Teil der morphologisch nicht zu unterscheidenden Chromosomen weiter differenziert werden. Es gibt allerdings Chromosomen, zum Beispiel die Gruppen 6 - 12 und 19 - 20, bei denen die Methode der Chromosomenautoradiographie keine Fortschritte

in der Identifizierung brachte. Die vorliegenden Untersuchungen sollten klären, ob sich mit einem anderen DNS-Baustein, und zwar mit Cytidin, bessere Resultate erzielen lassen. Dabei wurden zunächst nur die Chromosomen 1, 4 - 5 und 13 - 15 betrachtet, die nach Markierung mit Tritium-Thymidin besonders charakteristische Replikationsmuster aufweisen und sich aus diesem Grund für einen Vergleich gut eignen.

## Verteilung der Replikationsmuster nach der Markierung mit Tritium-Cytidin

### Chromosomenpaar Nr. 1

Das Chromosomenpaar Nr. 1 durchlief mit beiden Homologen regelmäßig ein typisches Markierungsmuster, welches die Einteilung in Früh-, Übergangs- und Spätstadium ermöglichte. Diese Einteilung diente als Grundlage für die nähere Bestimmung der anderen untersuchten Gruppen, für die sich folgende Verteilung der Replikationsmuster ergab:

### Gruppe 4 - 5

Im Frühstadium waren 40 % der untersuchten Figuren nicht zu differenzieren, da beide Paare vollständig markiert waren, während in 60 % der Fälle ein Paar (Nr. 5) die Replikation im proximalen Teil des langen Armes bereits abgeschlossen hatte.
Im Übergangsstadium war bei einem Paar (Nr. 5) der proximale Abschnitt des langen Armes in allen untersuchten Figuren unmarkiert. Das andere Paar (Nr. 4) war in 65 % der Figuren noch völlig unmarkiert, während bei den restlichen 35 % eine unmarkierte Re-

gion im medialen Teil des langen Armes beobachtet werden konnte. Im Spätstadium war ein Paar (Nr. 4) in 35 % der ausgewerteten Mitosen noch vollständig markiert, in 65 % hatte es die Replikation über dem medialen Teil seines langen Armes abgeschlossen. Bei dem anderen Paar war der proximale Abschnitt des langen Armes in 44 % unmarkiert, während in 66 % nur noch der kurze Arm markiert war.
Für die Differenzierung der beiden Paare dieser Gruppe eignet sich am besten das Übergangsstadium, in dem das eine Paar (Nr. 4) meist noch völlig markiert ist, während das andere Paar (Nr. 5) im proximalen Teil seines langen Armes eine deutlich unmarkierte Region aufweist.

Gruppe 13 - 15

Im Frühstadium war bei einem Paar (Nr. 13) in 50 % der ausgewerteten Figuren die Replikation über dem kurzen Arm abgeschlossen, während die anderen 50 % noch über ihre ganze Länge markiert waren. In allen Figuren war das zweite Paar vollständig markiert (Nr. 14), und das dritte Paar hatte die Replikation über seinem langen Arm abgeschlossen (Nr. 15).
Im Übergangsstadium war bei Nr. 13 in fast allen untersuchten Mitosen (87,5 %) die Replikation über dem kurzen Arm beendet. Nr. 14 hatte in 50 % die Replikation über dem distalen Teil des langen Armes abgeschlossen, während bei den anderen 50 % noch eine vollständige Markierung vorlag. Bei Nr. 15 wiesen 94 % eine Markierung über dem kurzen Arm auf.
Im Spätstadium konnte man bei 90 % der ausgewerteten Figuren beobachten, daß Nr. 13 noch über der distalen Hälfte seines langen

Armes markiert war. Nr. 14 zeigte in 80 % der Figuren nur noch über dem proximalen Ende seines langen Armes und über seinem kurzen Arm eine Markierung, während 20 % bereits völlig unmarkiert waren. Nr. 15 hatte in allen untersuchten Mitosen seine Replikation vollständig abgeschlossen.

Auch bei dieser Gruppe eignet sich das Übergangsstadium am besten zur Unterscheidung der drei Paare.

Verteilung der Replikationsmuster nach der Markierung mit Tritium-Thymidin

(Zusammenfassung von bereits durchgeführten Arbeiten)

Chromosomenpaar Nr. 1

Der früh unmarkierte Abschnitt am distalen Ende des einen Armes dieses Paares wurde zuerst von MORISHIMA et al. (1962) beschrieben. SCHMID bezeichnete diese Phase als Frühstadium.
Das Spätstadium zeichnet sich dagegen durch die alleinige Markierung eines zentromernahen Abschnitts am gegenüberliegenden Arm aus. (MOORHEAD und DEFENDI, 1963; SCHMID, 1963; GEY, (1966)
GEY führte außerdem noch den Begriff des Übergangsstadiums ein, in dem Nr. 1 über dem einen Arm in einem medialen Abschnitt, über dem anderen Arm in einem proximalen Streifen und in einer zentromernahen Region eine Markierung zeigt.
Die Verteilung und der Ablauf der Markierung wurden durch die Silberkornzählungen von BÜCHNER et al. (1968) bestätigt.

Gruppe 4 - 5

SCHMID (1963) wies als erster darauf hin, daß die Paare dieser Gruppe am besten im Übergangsstadium voneinander unterschieden werden können. In dieser Phase ist das eine Paar (Nr. 4) noch ganz markiert, während das andere (Nr. 5) die Replikation über seinem langen Arm von proximal nach distal fortschreitend abschließt (bei GEY 92,5 %). Im Spätstadium ist Nr. 4 nur noch über seinem kurzen Arm markiert (bei GEY 80 %); Nr. 5 hat die Replikation im medialen Teil seines langen Armes beendet (bei GEY 50 %). Die Arbeit von BÜCHNER et al. bestätigt im wesentlichen diese Ergebnisse.
PÄTAU et al. (1964) und GERMAN et al. (1964) stellten mit Hilfe der Tritium-Thymidin-Autoradiographie beim "Cri du chat"-Syndrom fest, daß das am kurzen Arm defiziente Chromosom dem Paar Nr. 5 zugehört. Eine Defiziens am kurzen Arm eines Chromosoms des Paares Nr. 4 beobachtete WOLF et al. (1965), hierbei trat nicht das klinische Bild des "Cri du chat"-Syndroms auf.

Gruppe 13 - 15

MORISHIMA et al. beschrieben 1962, daß ein Paar (Nr. 15) früh unmarkiert wird. SCHMID (1963) und GEY (1966) beobachteten ferner, daß im Übergangsstadium ein Paar (Nr. 13) intensiv über dem langen Arm und das zweite Paar (Nr. 14) über der Zentromer-Region oder dem kurzen Arm markiert ist, während das dritte Paar (Nr. 15) seine Replikation vollständig abgeschlossen hat.
Im Spätstadium zeigten bei GEY 75 % der ausgewerteten Mitosen folgende Verteilung: Nr. 13 ist nur noch über dem langen Arm und Nr. 14 über dem Zentromer oder dem kurzen Arm markiert, wäh-

rend Nr. 15 die Replikation völlig abgeschlossen hat. BÜCHNER fand ebenfalls diese Verteilung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß zwischen den Replikationsmustern nach einer Tritium-Cytidin und einer Tritium-Thymidin-Markierung keine wesentlichen Unterschiede bestehen. Es muß nun geprüft werden, ob diese Feststellung auch für die übrigen Chromosomengruppen des menschlichen Genoms zutrifft.

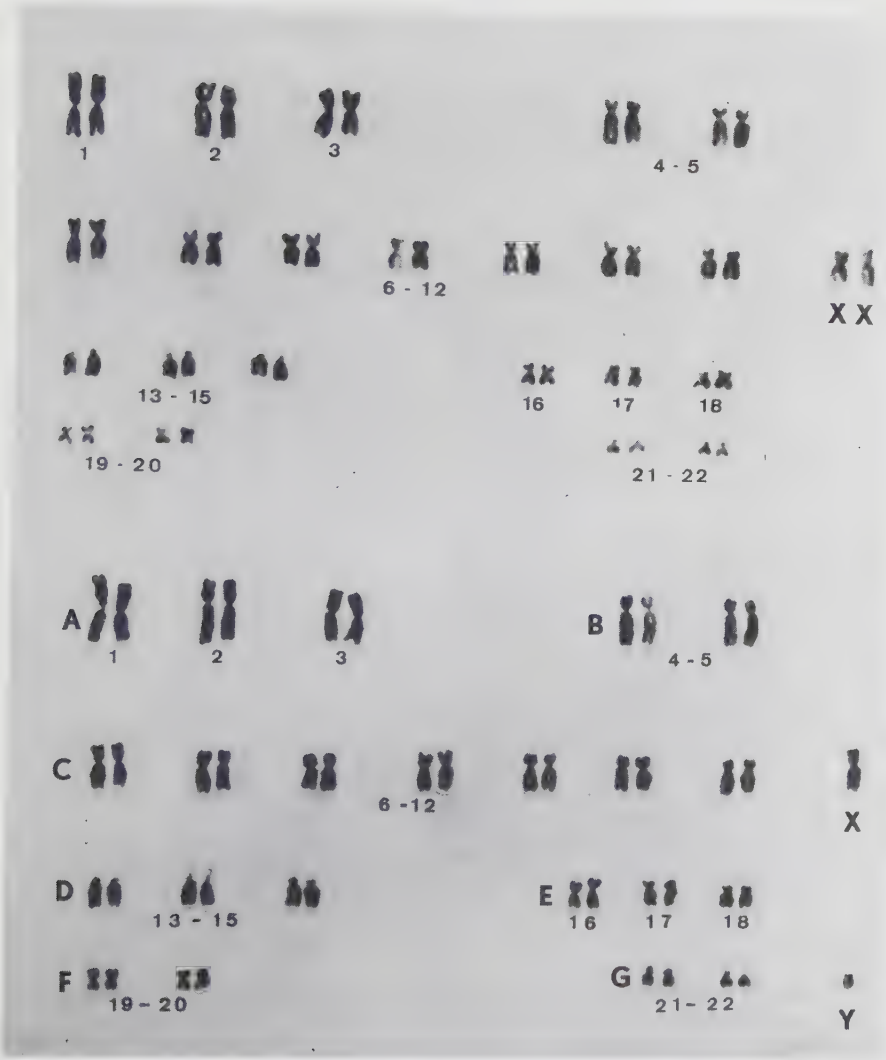


Abb. 1: Zwei normale menschliche Karyotypen:
a) weiblich, b) männlich

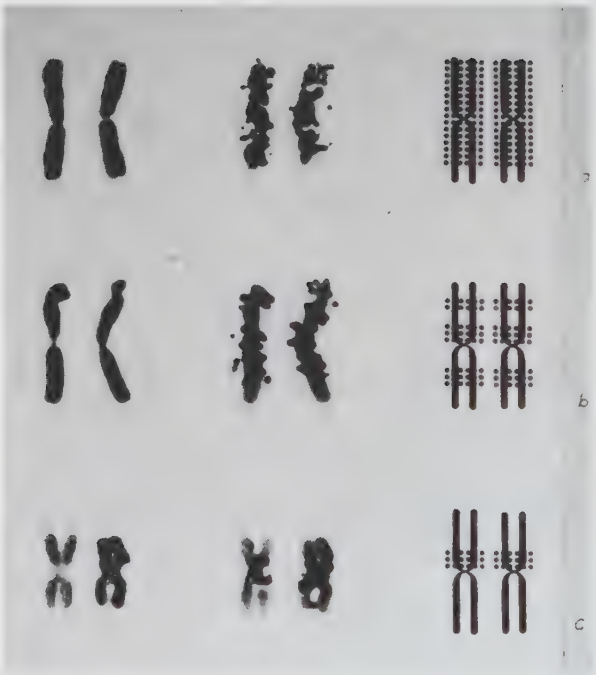


Abb. 2: Chromosomenpaar Nr. 1 in den drei Stadien:
a) Frühstadium, b) Übergangsstadium und c) Spätstadium.
Links unmarkierte Kontrollchromosomen, in der Mitte die gleichen Chromosomen nach der Autoradiographie,
rechts schematische Darstellungen der Replikationsmuster am Ende der S-Periode.

Abb. 3: Die Chromosomen der Gruppe 4 - 5 in den Phasen a - e (siehe S. 9 - 10). Links unmarkierte Kontrollchromosomen, in der Mitte die gleichen Chromosomen nach der Autoradiographie, rechts schematische Darstellungen der Replikationsmuster am Ende der S-Periode.

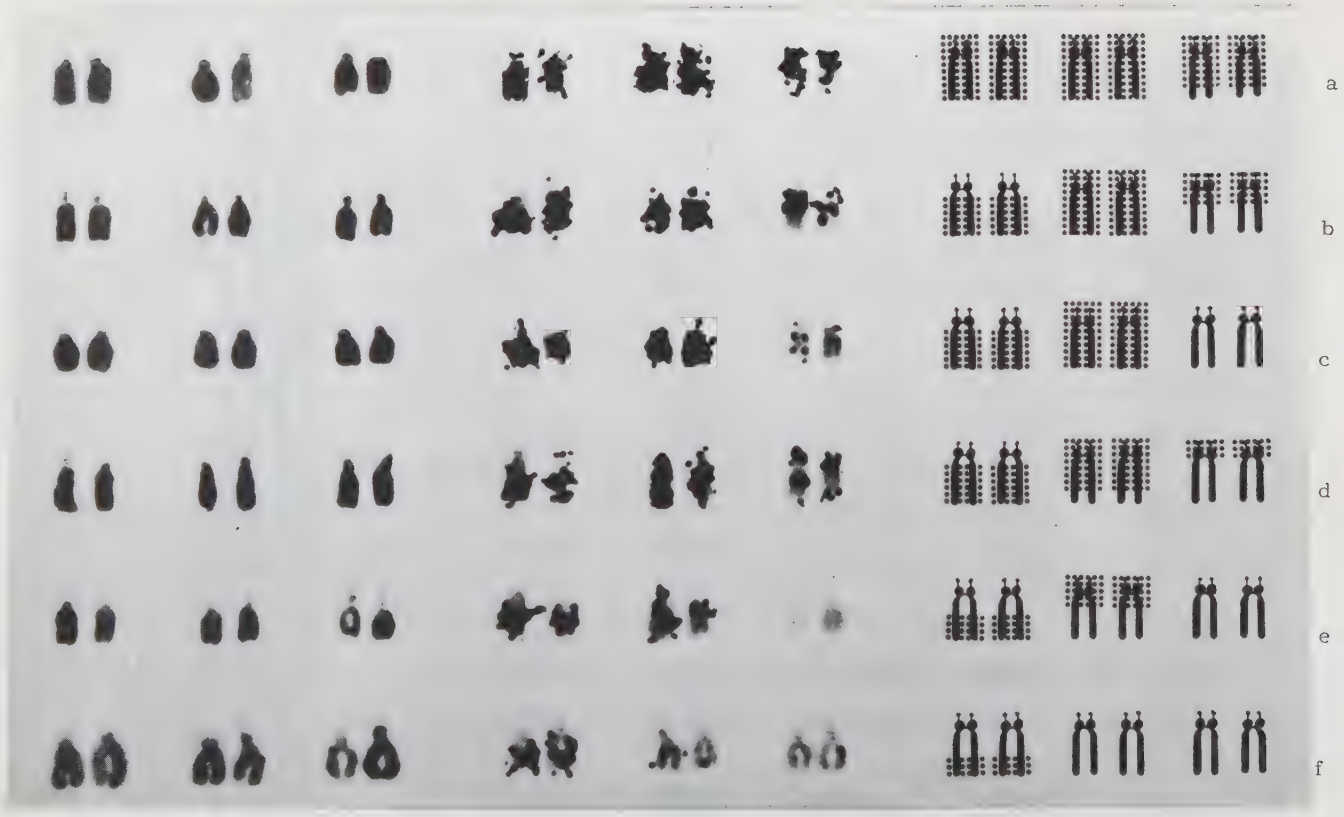


Abb. 4: Die Chromosomen der Gruppe 13 - 15 in den Phasen a - f (siehe S. 11 - 12). Links unmarkierte Kontrollchromosomen, in der Mitte die gleichen Chromosomen nach der Autoradiographie, rechts schematische Darstellungen der Replikationsmuster am Ende der S-Periode.

Abb. 5: Mitose einer weiblichen Normalperson im Frühstadium:
a) Autoradiographie; Nr. 1: distaler Teil des einen Armes unmarkiert. Nr. 4-5: beide Paare noch vollständig markiert (Bezeichnung willkürlich gewählt). Nr. 13: proximal nur schwach markiert. Nr. 14: vollständig markiert. Nr. 15: fast unmarkiert. - b) Kontrollbild der gleichen Mitose.

Abb. 6: Mitose einer männlichen Normalperson im Übergangsstadium:
a) Autoradiographie: Nr. 1: über einem schmalen Streifen in der Mitte beider Arme und in Zentromernähe des einen Armes markiert. Nr. 4: vollständig markiert. Nr. 5: über dem proximalen Teil des langen Armes unmarkiert. Nr. 13: proximal unmarkiert. Nr. 14: distal unmarkiert. Nr. 15: noch schwach markiert. - b) Kontrollbild der gleichen Mitose.

Abb. 7: Mitose einer weiblichen Normalperson im Spätstadium:
a) Autoradiographie; Nr. 1: Markierung an einem Arm in Zentromernähe. Nr. 4: proximaler Teil des langen Armes unmarkiert. (Asynchronie der Homologen). Nr. 5: kurzer Arm noch stark markiert. Nr. 13: proximal unmarkiert. Nr. 14: distal unmarkiert. Nr. 15: ganz unmarkiert.
b) Kontrollbild der gleichen Mitose.

Abb. 7

## LITERATUR

ABE, T.: Autoradiographische Studien über die DNS-Replikation der menschlichen mitotischen Chromosomen.
Japanese Journal of Human Genetics 14, 107 - 139 (1969).

ATKINS, L., K.H. GUSTAVSON, and O. HANSSEN: A case of XXXXY sex chromosome anomaly with autoradiographic studies.
Cytogenetics 2, 208 - 231 (1963).

BACK, F., P. DÖRMER, P. BAUMANN und E. OLBRICH:
Zur Problematik der Chromosomenautoradiographie: Autoradiographische Untersuchungen an den G-Chromosomen bei Mongolismus.
Humangenetik 4, 305 - 319 (1967).

BÜCHNER, Th., A. WILKENS und R.A. PFEIFFER:
Autoradiographisches Markierungsmuster der Chromosomen Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 13-15, 16 und Grad der Übereinstimmung der Homologen nach Einbau von H3-Thymidin während der späten S-Phase. Quantitative Untersuchungen an Zellen der Blutkultur.
Klinische Wochenschrift, 46. Jahrgang, 4. Heft, 187 - 194 (1968).

GERMAN, J.L.: DNA synthesis in human chromosomes.
Trans. N.Y. Acad. Sci. 24, 395 - 407 (1962).

-- The pattern of DNA synthesis in the chromosomes of human blood cells.
J. Cell Biol. 20, 37 - 55 (1964).

--, J. LEJEUNE, M.N. MACINTYRE, and J. DE GROUCHY:
Chromosomal autoradiography in the Cri du chat syndrome.
Cytogenetics 3, 347 - 352 (1964).

GEY, W.: Untersuchungen über die DNS-Replikationsmuster der Chromosomengruppen 4 - 5, 13 - 15 und 21 - 22 an in vitro gezüchteten menschlichen Lymphocyten.
Humangenetik 2, 246 - 261 (1966).

GIANELLI, F.: The pattern of X-chromosome deoxyribonucleic acid synthesis in two women with abnormal sex-chromosome complements.
Lancet 1963/I, 863 - 865.

-- Autoradiographic identification of the D (13-15) chromosome responsible for $D_1$ trisomic Patau's syndrome.
Nature 208, 669 - 672 (1965).

-- and R.M. HOWLETT: The identification of the chromosomes of the E-group (16-18 Denver): an autoradiographic and measurement study.
Cytogenetics 6, 420 - 435 (1967).

GILBERT, C.W., S. MUDAL, L.G. LAJTHA, and J. ROWLEY: Time-sequence of human chromosome duplication.
Nature (Lond.) 195, 869 - 873 (1962).

-- -- -- --: Rate of chromosome duplication at the end of the deoxyribonucleic acid synthetic period in human blood cells.
Nature 208, 159 - 161 (1965).

HSU, T.C., and L.H. LOCKHART: The beginning and the terminal stages of DNA synthesis of human cells with an XXXXY constitution.
Hereditas (Lund) 52, 320 - 324 (1964).

HUNGERFORD, D.A.: Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl.
Stain Technology 40, 333 - 338 (1965).

MOORHEAD, P.S., and V. DEFENDI: Asynchrony of DNA synthesis in chromosomes of human diploid cells.
J. Cell Biol. 16, 202 - 209 (1963).

MORISHIMA, A., M.M. GRUMBACH, and J.H. TAYLOR: Asynchronous duplication of human chromosomes and the origin of sex chromatin.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 48, 756 - 763 (1962).

MUKHERJEE, B.B., and A.K. SINHA: Further studies on the pattern of chromosome duplication in cultured mammalian leucocytes.
Canad. J. Genet. Cytol. 5, 490 - 495 (1963).

-- --: Single-active X-hypothesis: cytological evidence for random inactivation of X-chromosomes in a female mule complement.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 51, 252 - 259 (1964).

PÄTAU, K., E. THERMAN, and S.L. INHORN: Annual meeting, American Society of Human Genetics, Boulder, Colorado, USA, August, 28, 1964.

PETERSEN, A.J.: DNA synthesis and chromosomal asynchrony: induced parasynchronous DNA synthesis in human leucocyte cultures and chromosomal asynchrony in the early S phase.
J. Cell, Biol. 23, 651 - 654 (1964).

SCHMID, W.: DNA replication patterns of human chromosomes. Cytogenetics 2, 175 - 193 (1963).

-- : Autoradiography of human chromosomes. In 'Human Chromosome Methodology' (ed. J.J. Yunis). New York: Acad. Press Inc. 1965.

--: Heterochromatin in mammals. Archiv der Julius Klaus-Stiftung für Vererbungsforschung, Sozialanthropologie und Sozialhygiene (Zürich) 17, Heft 1/2 (1967).

TIJO, J.H., and A. LEVAN: The chromosome number of man. Hereditas (Lund) 42, 1 - 6, (1956).

WOLF, U., H. REINWEIN, R. PORSCH, R. SCHROETER und H.BAITSCH: Defiziens an den kurzen Armen eines Chromosoms Nr. 4. Humangenetik 1, 397 - 413 (1965).

YUNIS, J.J., E.B. HOOK, and M. MAYER: Deoxyribonucleic-acid replication pattern of trisomy $D_1$. Lancet 1964/II, 935 - 937.

Herrn Professor Betke möchte ich dafür danken, daß er es ermöglicht hat, diese Arbeit an der Kinderklinik der Universität München im Dr. v. Hauner'schen Kinderspital durchzuführen.

Für die Einführung in die Technik der Chromosomenautoradiographie und die freundliche Unterstützung bei der Abfassung dieser Arbeit möchte ich Herrn Dr. W. Gey meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Lebenslauf:

Heide Koschel, geb. Lörcher

| | |
|---|---|
| 1. 9.1945 | Geboren in Stuttgart als jüngstes von sieben Kindern. Eltern: Dr. E.L. Lörcher, Oberstudienrat a.D., und Frau Margot, geb. Prestinari, Kunsthändlerin. |
| 6. 5.1952 | Schuleintritt in die Grundschule in Stuttgart-Degerloch |
| 10. 4.1956 | Schuleintritt in das Königin-Charlotte-Gymnasium. Stuttgart |
| 5. 3.1965 | Reifeprüfung |
| So.Sem.65 | Studienbeginn an der medizinischen Fakultät in München |
| 26. 4.1966 | Naturwissenschaftliche Vorprüfung |
| 26.10.1967 | Ärztliche Vorprüfung |
| 22. 8.1969 | Heirat: Ehemann Dirk Koschel, cand. ing. |
| Sommer 1972 | Staatsexamen an der Ludwig-Maximilians-Universität München |